

**METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR VERGLEICHENDEN BEURTEILUNG
VON SPERMAQUALITÄT UND MIGRATION
IM ZERVIKALEN MUKUS**

Richard Meiers

1987

AUS DER I. FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORSTAND: PROF. DR. MED. J. ZANDER

METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR VERGLEICHENDEN BEURTEILUNG
VON SPERMAQUALITÄT UND MIGRATION IM ZERVIKALEN MUKUS

DISSERTATION

ZUM ERWERB DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN

AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON

RICHARD MEIERS

AUS ENSDORF

JAHR

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. med. J. Zander

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Hepp

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. S. Palm

Dekan: Professor Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.1987

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. J. Zander für die

Überlassung des Themas und Herrn Dr. med. S. Palm

für die Betreuung der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Einleitung	1
1.2 Klinische Sterilitätsdiagnostik	1
1.2.1 Konventionelle Methoden	3
1.2.2 Neue diagnostische Ansätze	4
2. Ziele	5
3. Material und Methode	8
3.1 Population	8
3.2 Konventionelle Samenanalyse	9
3.3 Das motile Potential (MP)	9
3.4 Zervixmukus-Spermatozoen-Penetrationstest	10
3.4.1 Zervixmukus - Rind	10
3.4.2 Standardisierung	10
3.4.3 Ablauf	14
3.5 Der PSC-Wert	15
3.6 Mikrofotografische Dokumentation	17
3.6.1 Versuchsaufbau	18
3.6.2 Meßbedingungen: Nativejakulat	19
3.6.3 Meßbedingungen: Migrationstest	20
3.6.4 Meßgrößen und Auswertung	20
3.7 Pilotstudie	22

	Seite
4. Ergebnisse	22
4.1 Nomographische Darstellungen innerhalb der Population	22
4.1.1 Spermiendichte	23
4.1.2 Dichteverteilung unter den andrologischen Aspekten: Oligo-, Normo- und Polyzoospermie	24
4.2 Funktionelle Zusammenhänge und Korrelationen	24
4.2.1 Nativejakulatdichte (C_E) und Mittlere Ge- schwindigkeit der motilen Spermien im Eja- julat (v_E)	24
4.2.2 Nativejakulatdichte (C_E) und prozentuale motile Spermienfraktion ($\%Mot$)	26
4.2.3 Motile Spermienfraktion ($\%Mot$) und ihre Mittlere Geschwindigkeit (v_E)	27
4.2.4 Nativejakulatdichte (C_E) und Motiles Potential (MP)	28
4.2.5 Nativejakulatdichte (C_E) und Migrations- dichte (C_M)	29
4.2.6 Motile Spermiendichte ($C_E\%$) und Migra- dichte (C_M)	30
4.2.7 Motiles Potential (MP) und Migrationsdichte (C_M)	31
4.2.8 Mittlere Geschwindigkeit (v_E) und prozen- tualer Anteil der migrierten Spermien ($C/C_M\%$)	32
4.2.9 Motiles Potential (MP) und prozentualer Anteil der migrierten Spermien ($C/C_M \cdot \%$)	33

	Seite
4.2.10 Possible Successfull Collisions Index (PSC) und seine Korrelationen	34
4.2.11 Vergleich des Migrationstests mit anderen Spermienfunktionstesten	37
5. Diskussion	38
6. Zusammenfassung	43
7. Literaturverzeichnis	44



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554617_0050

1. EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Einleitung

10% bis 20% aller Ehen sind ungewollt kinderlos (54). Dabei spricht man von einer sterilen Ehe, wenn nach zwei Jahren mit regelmäßigem Verkehr ohne Verhütungsmittel keine Gravidität eingetreten ist (51, 54). Bei Kinderlosigkeit liegt zum größten Teil Sterilität, das heißt das Unvermögen zu konzipieren beziehungsweise zu befruchten vor, zum geringeren Teil kann Infertilität, nämlich das Unvermögen, das Kind auszutragen, angenommen werden (38, 66). Die Ursachen der Kinderlosigkeit werden in der Literatur zu etwa 50% der Frau, zu 30% dem Mann und zu 20% beiden Partnern zugeschrieben (51, 54, 64, 66, 88, 89).

1.2 Klinische Sterilitätsdiagnostik

Bei der Diagnostik und Behandlung von Sterilitätspatienten in der Medizin ergeben sich verschiedene, zumeist methodisch bedingte Probleme (30, 31, 38, 64, 66). Während für die endokrin bedingte Sterilität der Frau eine Reihe diagnostischer Verfahren vorliegen (51, 54, 55, 77), stellen der Ausschluß nicht endokriner Sterilitätsfaktoren der Frau, sowie die Erfassung männlicher Sterilitätsfaktoren noch einen methodisch schwieriger zu fassenden Bereich dar.

Abb. 1: Faktoren, welche die Motilität von Spermien beeinflussen können.



Abb. 1 verdeutlicht die Vielfalt der exogenen und endogenen Faktoren, welche die Motilität von Spermien als wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Fertilisation beeinflussen kann (23, 38, 64, 75, 91, 59, 79, 80).

Während beim Mann andrologische Faktoren wie etwa eine Azoospermie oder eine Oligozoospermie, zumeist erworben nach spezifischen oder unspezifischen Infektionen der Harn- und Geschlechtsorgane, im Vordergrund stehen, machen bei der Frau pathologisch-anatomische sowie endogen bedingte Störungen mit etwa 80% die Hauptursachen einer Sterilität aus (51, 55, 77).

Als Beispiele seien hier die Tubensterilität bei chronischer Adnexitis und das Prolaktinom der Hypophyse genannt (51, 77).

Daneben aber finden sich bei einer kombinierten Sterilität in 5 bis 23% der Fälle keine bisher direkt zu fassenden Ursachen bei beiden Partnern (54, 89). Während gängige Methoden der Sterilitätsdiagnostik in ihren Gültigkeitsbereichen teilweise gut interpretierbare Aussagen erlauben, ist eine gestörte Interaktion zwischen Spermium, Mukus und Eizelle durch konventionelle Methoden nur sehr schwer abzuklären.

1.2.1 Konventionelle Methoden

Ein primäres Testverfahren zur Abklärung der Fertilität beim Mann ist die Erstellung eines Spermiogramms (22, 91). Durch eine mikroskopische Untersuchung eines Ejakulates kann relativ einfach und schnell z.B. eine Einschränkung der Zellzahl oder eine Beweglichkeitsstörung als Ursache einer Sterilität aufgedeckt werden (20, 21, 23, 38, 81). Spermienmigration und Fertilisation unterliegen den allgemeinen Gesetzen der Zellinteraktion wie Migration, Erkennung und Fusion (6, 14, 67). Diese Kinetiken bestimmen die weiteren diagnostischen Verfahren.

Ziel solcher Testverfahren ist es, Hinweise auf Änderungen der Spermienmigration im weiblichen Genitaltrakt zu erhalten, ein Vorgang der zur Kapazitation der Samenzelle beiträgt und sie zur Fertilisation der Eizelle befähigt (7, 32, 33, 42, 43, 44). Zellinteraktionen mit dem weiblichen Genitalsekret unterstehen hormonellen Einflüssen (12, 65).

Im Rahmen der klinischen Diagnostik ist es mit nichtinvasiven Methoden primär möglich, Phänomene der Migration zu erfassen. Am geläufigsten ist der Postkoitaltest (PCT) nach Sims-Huhner (81), der aber nur bedingt als Screeningverfahren anzusehen ist. Seine Beurteilung ist schwierig und seine Aussagefähigkeit wird ganz entscheidend von der Kooperation der Patienten beeinflusst (17, 18, 28, 29, 34, 35, 45, 68, 82, 84).

Auch der Invasionstest nach Kurzrok-Miller ist nur bedingt einer objektiven Bewertung zugänglich. (2, 3, 10, 16, 25).

Beide Testverfahren erlauben hauptsächlich qualitative Aussagen (19, 27, 56).

1.2.2 Neue diagnostische Ansätze

In den letzten Jahren haben verschiedene Arbeitsgruppen wie Aitken (1), Amit (3), Katz (39, 40, 41, 42), Yanagimachi (90), Rogers (78), Barros (5), Bedford (6), Makler (57, 59, 60), Overstreet (73, 74), Lopata (52, 53) und Palm (76) neue Methoden der Sterilitätsdiagnostik und Fertilitätsdiagnostik entwickelt.

In diesem Zusammenhang soll auch erwähnt werden, daß bei der Behandlung von bestimmten Sterilitätspatienten seit einigen Jahren als reproduzierbare Methode die in-vitro-Fertilisation (IVF) mit nachfolgendem Embryotransfer (ET) verstärkt zur Anwendung kommt (92).

2. Ziele

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, Basismethoden für eine funktionelle Diagnostik zu entwickeln.

Wie alle Screening-Verfahren, so sollten auch unsere Methoden relativ schnell und einfach durchzuführen, nicht mit zu großem methodischem und finanziellem Aufwand verbunden und jederzeit reproduzierbar sein.

Dabei sollte bei verbesserter Objektivität der neuen Screening-Verfahren, den allgemeinen Gesetzmäßigkeiten der Zellinteraktion wie Migration, Erkennung und Fusion entsprochen werden (6, 14).

Die Schwerpunkte lagen auf der Interaktion von Spermium und cervikalem Mukus.

Milieuveränderungen (z.B. Genitalsekret) sollten bei der Reaktion des Spermatozoons gegenüber einer individuellen Pathologie der Zelle abgegrenzt werden (2, 3, 30, 31, 44, 61, 75, 78, 80).

Das Hauptziel war die Entwicklung objektivierbarer und quantifizierbarer Bewertungskriterien der Spermatozoenfunktion unter möglichst physiologischen Bedingungen.

Neben der Entwicklung einer Mikrofotografischen Methode zur objektiveren Beurteilung der Spermatozoenmotilität sollte vor allem die fotomethodisch-quantitative Beschreibung der Spermienmigration im Mukus in einem in-vitro System dargestellt werden.

Durch die definierte in-vitro Testung sollte eine Standardisierung unter weitgehendem Ausschluß nicht erfaßbarer individueller Parameter erreicht werden.

Neben der größeren Objektivität wird bei weitgehender Normierung ein Maximum an Reliabilität angestrebt, wobei Korrelationen der Meßergebnisse mit der Klinik eine direkte Überprüfung der Validität zulassen. Bedenkt man die oft langwierige Behandlungsdauer von Sterilitätspatienten (38, 51, 54), so stellt vor allem die Möglichkeit der photographischen Archivierung bei der Mikrofotografischen Methode eine wesentliche Hilfe für die Verlaufskontrolle dar.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war schließlich die quantitative Definition funktioneller Normbereiche.

Trotz unterschiedlicher funktioneller Parameter sollte das Normalverhalten der Spermium-Mukus-Eizellen-Interaktion innerhalb phänomenologisch gefundener Normwertbereiche beschrieben werden.

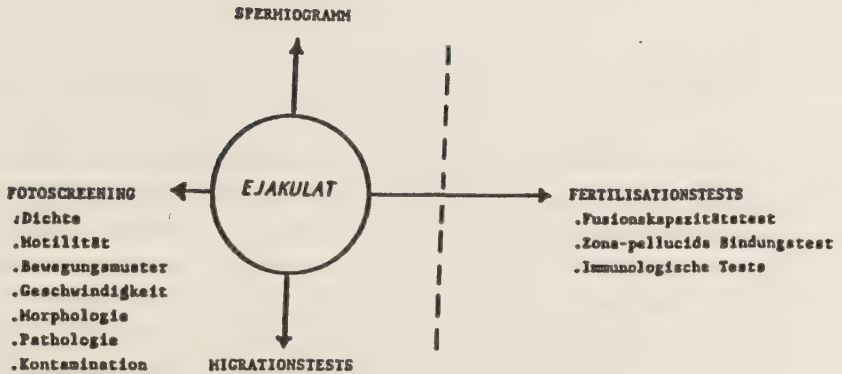


Abb.2: Testverfahren im Rahmen der Fertilitätsdiagnostik

In der graphischen Darstellung wird das Vorgehen verdeutlicht. Die Korrelation der gemessenen Parameter untereinander soll die funktionellen Zusammenhänge in der Interaktion von Spermatozoen und cervikalem Mukus erkennen lassen.

3. Material und Methode

3.1 Population

In einer ersten Phase der Untersuchung wurden 39 Patienten aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München sowie Kontrollprobanden in die Testreihe eingebracht. In einer zweiten Phase wurden weitere 49 Patienten und interne Kontrollen untersucht. Die Patienten dieser zweiten Phase waren Ehepaare, die wegen vorliegender Sterilität in der I. Universitäts-Frauenklinik München betreut wurden. Hier war es auch möglich, retrospektiv klinische Daten und Versuchsergebnisse miteinander zu vergleichen, während die Gruppe der ersten Phase primär dazu beitrug, unterschiedliche Zellfunktionsparameter zu untersuchen.

Die Patienten sowie die Kontrollspender wurden, ehe sie in das Testsystem aufgenommen wurden, verpflichtet, die Versuchsbedingungen, insbesondere die Beachtung der Karenzzeit vor der Ejakulaspende, einzuhalten (4, 79).

Bei den Kontrollprobanden handelte es sich ausschließlich um Männer, bei denen in den vorangegangenen zwölf Monaten ein Kind gezeugt wurde. Die untersuchten Männer aus der Dermatologie/Andrologie wiesen unterschiedlichste Ejakulatparameter (außer Azoospermie) auf.

3.2 Konventionelle Samenanalyse

Die Ejakulate wurden nach mindestens 4-tägiger Karenz der Probanden gewonnen und in sterilen, verschließbaren Plastikbechern bei $+37^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank zur Verflüssigung gebracht (39). Anschließend wurde das Gesamtvolumen gemessen um ohne Verzug in die vorbereitete Versuchsanordnung aufgenommen zu werden.

Während der größte Teil des Ejakulates für die mikrofotografische Untersuchung sowie für die Migrationstestung verwendet wurde, wurde der kleinere Teil des verflüssigten Ejakulates für die Erstellung eines Spermigramms verwendet.

Die Analyse erfolgte im allgemeinen 30 Minuten nach der Gewinnung der Proben (59, 61).

Volumen und Zelldichte wurden in üblicher Weise bestimmt (7, 22, 78).

3.3 Das motile Potential (MP)

Zur generellen Beurteilung der Ejakulatqualität wurde das motile Potential (MP) eines Ejakulates berechnet, worunter das Produkt aus Spermiedichte im Ausgangsejakulat (C_E) und der mittleren Geschwindigkeit der motilen Spermatozoen im Ejakulat ($\bar{v}_E$) verstanden wird.

3.4 Zervixmukus-Spermatozoen-Penetrationstest

Neben der Samenanalyse wurde das Verhalten der Spermatozoen im Kontakt mit dem cervikalen Mucus der Frau quantitativ beschrieben. Dies erfolgte im Zervixmukus-Spermatozoen-Penetrationstest.

3.4.1 Zervixmukus - Rind

Um individuelle Variationen auszuschließen, war die Verwendung eines definierten Ersatzmucus notwendig, der dem Humanmucus weitgehend entsprach.

Wir verwendeten dazu klaren, gut spinnbaren Östrusmucus mit minimaler zellulärer Kontamination, der aus dem Genitaltrakt frisch geschlachteter Rinder gewonnen wurde. Wie schon von anderen Autoren beschrieben (8, 9, 25, 26, 49, 87) eignet sich dieses Medium besonders gut als Ersatz für den zervikalen Mucus der Frau und bietet darüberhinaus wesentliche Vorteile für eine Standardisierung der Spermienmigrationsuntersuchung durch eine Screeningmethode.

Der bovine Zervixmukus läßt sich schnell in großen Mengen sammeln. Eingefrorene Portionen lassen sich über Monate aufbewahren, nachdem der Mucus mittels einer modifizierten Ringerlösung auf ein bestimmtes Mischungsverhältnis homogenisiert wurde (11, 78, 83).

3.4.2 Standardisierung

Im Direktvergleich mit Humanmucus wurde ein optimales Volumenmischungsverhältnis von gewaschenem und somit relativ zellfreiem zervikalem Rindermucus zu Kulturmedium wie 1.5 zu 1 gefunden (Abb. 3). Hierbei fanden sich optimale Migrationsbedingungen.

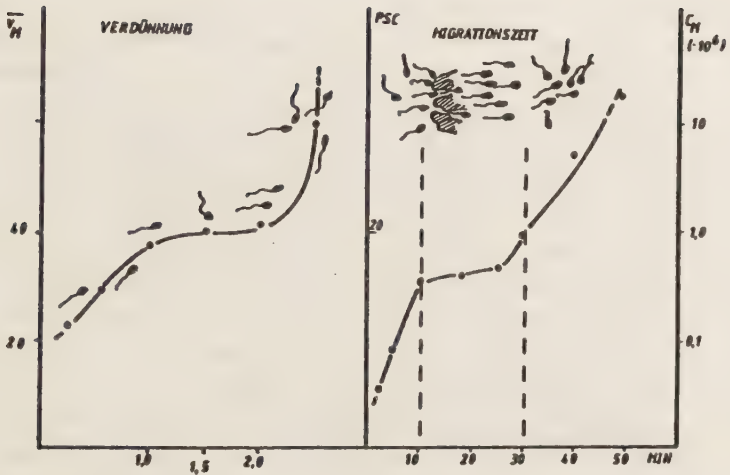


Abb. 3: Verhalten der Spermien bei unterschiedlichen Mukusverdünnungen und verschiedenen Laufzeiten im Migrationstest

$\bar{v}_M$ = Mittlere Spermengeschwindigkeit im Mukus ($\mu\text{m/s}$)

C_M = Spermiedichte im Mukus (Spermien/ml)

PSC = Possible successful collisions Index

Dabei diente der PSC-Wert (39) in seinem stabilen Bereich um 20 sowie eine Durchschnittsgeschwindigkeit der migrierten Spermien von etwa $40 \mu\text{m/s}$, was der durchschnittlichen Geschwindigkeit von Spermien in optimalem Humanmukus entspricht (50, 56) als Beurteilungsmaßstab. Bei höherer oder geringerer Verdünnung wurden die Migrationen unkoordiniert. Bei der Festlegung der Migrationsdauer zeigte sich, daß nach einer initialen Phalanxformation in den ersten 10 Minuten eine koordinierte und relativ parallele Einwandung der Spermien in den zervikalen Mukus des Rindes bis zu einer Migrationsdauer von etwa 30 Minuten stattfand, wobei der PSC-Wert relativ konstant bei einem Wert um 20 lag (Abb. 3). Aufgrund dieser Beobachtung wurde für die gesamte Studie für die Migration der Spermien eine Laufzeit von 30 Minuten gewählt.

Abb. 4 (Seite 13) zeigt die Gewinnung und Standardisierung des zervikalen Rindermukus als Standardmedium schematisiert. Das Proportionieren des Mukus erfolgte dabei in Mengen zu 1 bis 2 ml in Eppendorfgefäße, die bei -40°C eingefroren gelagert wurden, wodurch keine signifikante Änderung im biochemisch-physikalischen Verhalten nach dem Auftauen eintritt, was auch Untersuchungen anderer Autoren entspricht (49).

Für die Dauer der gesamten Migrationsstudie stand somit ein Migrationsmedium zur Verfügung, das Aussagen über die Spermienmigration bei konstanten und reproduzierbaren Bedingungen zuließ.

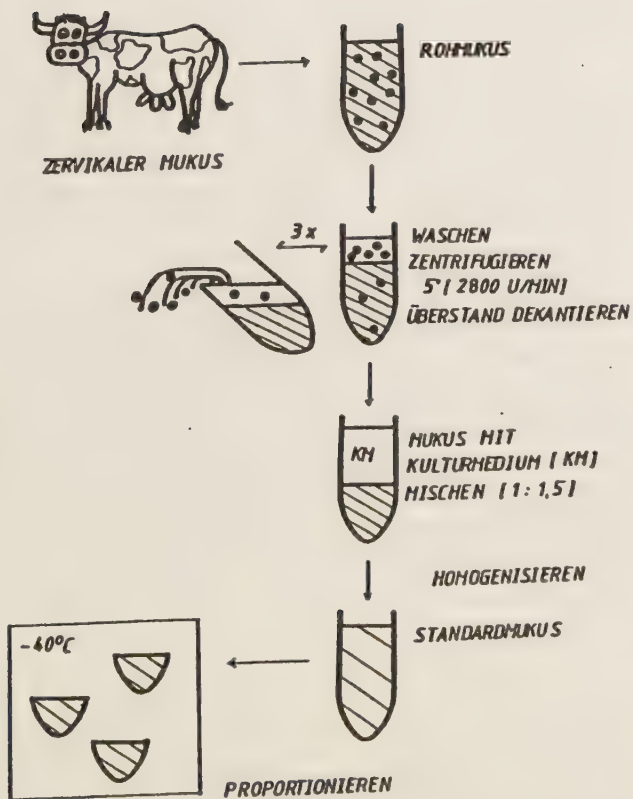


Abb. 4 Standardisierung des zervikalen Rindermukus im Schema

3.4.3 Ablauf

Alle Migrationen wurden unter konstanten Bedingungen durchgeführt. So betrug die Temperatur + 37°C, die Migration erfolgte über 30 Minuten im Brutschrank in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre in Flachkapillaren (Mikroschlides: Camblab, Cambridge, UK Ref.Nr. 3530 Pathlength 0,3 mm), die bei einer Höhe von 0,3 mm, einer Breite von 3mm und einer Länge von 5 cm (Innenmaße) sich im Durchschnitt bis zu 4,5 cm mit Mucus auffüllen ließen. Die Kapillaren wurden zur Migration nahezu senkrecht in jeweils 100 µl Nativejakulat getaucht. Pro Versuch wurden wenigstens 2 Kapillaren verwendet und später ausgewertet. Als sehr nützlich erwies sich bei dem Migrationsversuch die Verwendung von Plastiktüpfelplatten, die je Tüpfel 100 µl Ejakulat aufnehmen konnten und dazu die eingestellte Flachkapillare in der entsprechenden Stellung hielt. Der gewölbte Boden der Tüpfel garantierte darüberhinaus einen ungehinderten Eintritt der Spermien in den Mucus (Abb. 5).



Abb. 5: Tüpfel mit 100 µl Ejakulat mit eingestellter Kapillare

Der Standardmukus wurde unmittelbar vor dem Versuch im Wasserbad aufgetaut, auf $+ 37^{\circ} \text{C}$ erwärmt und in die Kapillaren aufgezogen. Nach 30 Minuten Migration wurden die Kapillaren aus dem Nativejakulat genommen, die eingetauchten Enden mit 5%iger Dithioerythrollösung abgespült und mit einem sauberen Zellstofftuch abgewischt. Dann wurden die Kapillaren in entsprechend hergestellte und ebenfalls auf $+37^{\circ} \text{C}$ vorgewärmte Kapillarhalter gelegt (Abb. 6) und sogleich unter dem Mikroskop bei konstanter Temperatur von $+ 37^{\circ} \text{C}$ (Wärmekreuztisch) fotomikrografisch untersucht.

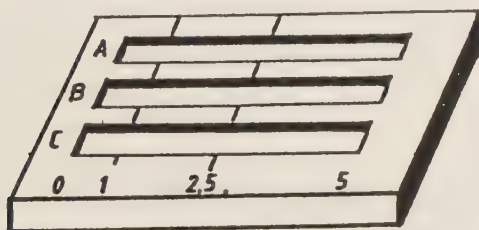


Abb. 6: Kapillarhalter

3.5 Der PSC-Wert

Über eine von Katz (39) entwickelte Formel, den sogenannten "Possible-successfull-collisions-Index" = PSC-Wert läßt sich die Migration in ein Medium qualitativ beurteilen.

Dabei wird die Auseinandersetzung der Spermien des Ejakulates mit dem Mukus an der Grenze der beiden Phasen untersucht, in Zeitabhängigkeit erfaßt und über die Formel $\text{PSC} = \frac{C}{C_M} \cdot \frac{L}{t} \cdot v_E$ beschrieben (Tab. 1).

Der PSC-Wert beschreibt somit als dimensionslose Zuordnung die erfolgte Kollision der Spermien im Bereich der Interphase zwischen dem Ejakulat und dem Mukus und verdeutlicht so die Potenz der Spermien, in den jeweiligen Mukus einzudringen.

$$\text{PSC} = \frac{C_M}{C_E} \cdot \frac{L}{t} \cdot \frac{1}{\bar{v}_E} \%$$

<u>dabei sei:</u>	C_E	=	Ejakulatdichte
	C_M	=	Spermiendichte im Mukus
	$\bar{v}_E \%$	=	Mittlere Geschwindigkeit der motilen Spermien im Ejakulat
	L	=	Mukushöhe der gefüllten Kapillaren
	t	=	Migrationszeit

aus der Versuchsanordnung ergibt sich:

L	=	4,5 cm
t	=	30 Minuten

für den Quotienten L/t ergibt sich:

$$L/t = 2,5 \cdot 10^{-1} (\mu\text{m/s})$$

weiter gilt: $\frac{C_M}{C_E} \cdot \frac{1}{\bar{v}_E} \approx 10^{-3} (\text{s}/\mu\text{m})$

$$400 \cdot L/t \approx 10^4$$

folgt: $\text{PSC} = 10^4 \cdot \frac{C_M}{C_E} \cdot \frac{1}{\bar{v}_E} \%$

somit gilt: $\text{PSC} = 400 \cdot \frac{C_M}{C_E} \cdot \frac{1}{\bar{v}_E} \% \cdot L/t$

Tab. 1: Der Possible-successfull-collisions-Index im standardisierten Migrationstest

Neben der Qualitätsbeurteilung des Migrationsmediums könnte der PSC-Wert auch eine Bedeutung für eine immer wieder diskutierte membranständige Reaktion in der Interaktion zwischen Spermatozoen und Mukus haben (7, 12, 25). Vergleicht man den Migrationserfolg von Spermienpopulationen, dokumentiert durch die Spermiedichte im Mukus (C_M), so ergeben sich in der funktionsgerechten Korrelation der Einzelergebnisse und bei der Beurteilung der Spermienqualität Schwierigkeiten, da die Dichte des Ejakulats den Migrationserfolg stark beeinflusst. Bedient man sich bei der Beurteilung verschiedener Fragestellungen des Quotienten $C_M / C_E \cdot 100\%$, der den prozentualen Migrationserfolg, bezogen auf die Dichte des Ejakulats angibt, so läßt sich dadurch die Effizienz einer Spermienpopulation besser beurteilen.

Darüberhinaus kann nun der PSC-Wert herangezogen werden, mögliche Spermienkollisionen zwischen Ejakulat und Mukusphase und die Zahl erfolgreich penetrierter Spermatozoen weitgehend unabhängig von der Ejakulatqualität zu beschreiben (39, 42), womit vergleichende Randbedingungen fertilisationsfähiger Spermien gewonnen werden.

Schließlich kann der PSC-Wert herangezogen werden, unterschiedliche Humanmukusproben mit dem Standard-Rindermukus qualitativ zu vergleichen.

3.6 Mikrofotografische Dokumentation

Die Zellbewegungen im Ejakulat wurden, wie auch die Motilitäten bei der Spermienmigration im Mucus, nach einer modifizierten von Overstreet beschriebenen Methode (71) mikrofotografisch registriert und ausgewertet.

3.6.1 Versuchsaufbau

Die Spermienbewegung wurde bei definierten Belichtungszeiten mit einer Kleinbildkamera mikrofotografisch erfaßt. Die Bilder wurden unter Verwendung eines Grünfilters zur besseren Kontrastwiedergabe im Dunkelfeld angefertigt. Dabei hoben sich seitlich angestrahlte Spermien von dem nun dunklen Hintergrund des Seminalplasmas leuchtend hell ab. Die Belichtung erfolgte bei Verwendung eines Phasenkontrastobjektivs mit 20-facher Vergrößerung über 2 Sekunden, bei 40-facher Vergrößerung über 1 Sekunde. Während dieser Zeit wanderten die motilen Spermien eine bestimmte Strecke und wurden so auf dem Film als entsprechende Leuchtspur abgebildet. Als Film wurde der Kleinbildfilm Ilford HP-5 (400 ASA) verwendet, der später 6 Minuten in Rodinal entwickelt wurde. Als Kamera verwendeten wir eine Olympus OM-2 mit Klarsichteinstellscheibe. Das Kameragehäuse war darüberhinaus mit einem Data-Back-Verfahren ausgestattet, um jedes Foto codieren zu können (Patienten-Nummer / Versuchs-Nummer etc). Die Belichtung erfolgte über eine Lichtschranke, die über eine Dunkelkammerbelichtungsuhr (Phillips) mit einer Abweichung von $\pm 10\%$ als Fehlertoleranz gesteuert wurde. Die Beurteilung der Filmnegative erfolgte nach den eigentlichen Tests, dem Spermogramm und den Migrationen, 20 Minuten danach oder am darauffolgenden Tag.

Die Filme (HP-5 400 ASA) wurden nach Entwicklung in Rodinal (6 Minuten) und nach dem Trocknen in Diarahmen gefaßt und am Dia-Meßtisch beurteilt.

Diesen Dia-Meßtisch entwickelten wir entsprechend einer Versuchsanordnung nach Overstreet (71). Über einen Diaprojektor (Kodak karussell) wurden die Negativbilder über einen Spiegel umgelenkt und auf eine Glasmattscheibe projiziert. Die Position des Projektors und die Bildweite wurden so justiert, daß einer Strecke von 0,1 mm auf dem Objektträger genau 10 cm auf der Mattscheibe entsprachen.

3.6.2 Meßbedingungen: Nativejakulat

20 µl des Nativejakulats wurden unmittelbar nach der Verflüssigung, maximal jedoch 30 Minuten nach der Gewinnung, auf einen auf $+37^{\circ}\text{C}$ vorgewärmten Objektträger aufgetragen. Das Deckglas wurde durch dünne Vaselinfüßchen stabilisiert, um ein unkontrolliertes Anpressen zu vermeiden. Anschließend wurde das Präparat auf einen bei $+37^{\circ}\text{C}$ temperaturstabilisierten Kreutztisch mikrofotografiert. Bei 400-facher Vergrößerung wurden 5 verschiedene Gesichtsfelder fotografiert und ausgewertet. Durch diese mikrofotografische Aufzeichnung der Motilität des Ejakulats war es möglich, die durchschnittliche Geschwindigkeit (v) der motilen Spermatozoen, sowie den prozentualen Anteil der motilen Spermien am Gesamtpool ($\% \text{Mot}$) zu messen.

3.6.3 Meßbedingungen: Migrationstest

Nach erfolgter Migration wurde die mikrofotografische Auswertung vorgenommen. Dabei wurden die Flachkapillaren in Kapillarhalter fixiert und untersucht (Abb. 6). Um einen Eindruck von der Einwanderungstiefe in den Mukus zu bekommen, wurden vom eingetauchten Ende der Flachkapillare aus im Abstand von 1,2 und 3 cm jeweils 3 bis 5 Bilder angefertigt. Dazu waren auf dem Kapillarhalter Markierungen im Zentimeterabstand eingefräst. Die Belichtungsdauer betrug bei jedem Foto 1 Sekunde. Anschließend wurden die Flachkapillaren auf definierte Volumina in bereitgestellte Eppendorfgeläße ausgeblasen. Es waren jeweils 100 μ l 5%ige Dithioerythrollösung als Lösungsmittel vorgegeben. Nach der Mukolyse wurde die Spermiedichte im Gesamtvolumen ermittelt und auf das ursprüngliche Mukusvolumen berechnet. Die Dichtebestimmung erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer (62, 63).

3.4 Meßgrößen und Auswertung

Mit der Fotomethode war es möglich, bei der anschließenden Auswertung der Fotonegative am Dia-Tisch Aussagen über die durchschnittliche Wanderungsgeschwindigkeit der Spermien im Mukus ($\bar{v}_M$), Einwanderungstiefe in den Mukus, sowie Migrationsformen und Migrationsqualität zu machen.

Entscheidend war neben der der Wanderungsgeschwindigkeit im Mukus ($\bar{v}$) vor allem der Migrationserfolg, erfaßt über die Konzentration der penetrierten Spermatozoen im Mukus. Die Migration wird in-vitro durch die Qualität des Mediums, der Spermatozoen, durch die Zeitdauer der Inkubation, sowie durch die Größenverhältnisse der Kapillare beeinflußt. Das Migrationsmedium wurde normiert über den Standardmukus, die Zeitdauer betrug konstant 30 Minuten und die Kapillaren wurden in gleicher Größe für die gesamte Studie verwendet. Somit blieb als wesentlicher variabler Parameter die Qualität der Spermatozoen in ihrem Seminalplasma, die durch das Migrationsverhalten im in-vitro System beschrieben werden sollte.

Mittels eines Landkartenkilometerzählers konnten die Migrationsstrecken auf der Mattscheibe nachgemessen und je nach Zeitdauer der Belichtung (1 oder 2 Sekunden) direkt in die jeweilige Geschwindigkeit des betreffenden Spermiums umgerechnet werden.

Die Auszählungen der motilen ("Strecken") und der immotilen Spermatozoen ("Flecke") auf den Negativbildern des Fotocreeningstests ergaben nach Umrechnung den prozentualen Anteil der motilen Spermien am Gesamtejakulat (%Mot).

Bakterielle Infektionen sowie morphologische Besonderheiten der Spermien ließen sich ebenfalls über dem Bildschirm leicht erkennen und mikrofotografisch dokumentieren. Die ermittelten Werte wurden jeweils auf vorgedruckten Auswertbögen vermerkt.

Da die jeweiligen Spermiendichten sehr variierten, war die Mattglasscheibe in 4 gleich große Teilfelder unterteilt. Je nach Anzahl der Spermatozoen auf dem Negativfoto erfolgte die Auszählung und Bewertung entweder über das gesamte Bildfeld oder wurde in einem Teilfeld vorgenommen und auf das Gesamtfeld hochgerechnet.

3.7 Pilotstudie

Bei der konventionellen Erstellung eines Spermioграмms ist eine objektive Auswertung nur bedingt möglich. Durch die Fotoscreening-Methode sollten Validität und Objektivität bei gleichbleibender Reliabilität verbessert und somit zuverlässigere Aussagen bei der Behandlung von Sterilitätspatienten ermöglicht werden. Die Meßgenauigkeit dieses Verfahrens galt es zuvor abzuklären. In einer Pilotstudie wurde die Präzision der fotomikroskopischen Messung verschiedener Parameter bei wiederholten Messungen eines Ejakulates untersucht. Für die Durchschnittsgeschwindigkeit ($\bar{v}_E$) der motilen Spermien des Ausgangsejakulates ergab sich eine Streuung von $+ / - 4,2\%$, der motile Anteil der Spermien in % der Ausgangsdichte schwankte um $+ / - 2,5\%$ und die durchschnittliche Geschwindigkeit des Ausgangsejakulates streute um $+ / - 3,3\%$ in ihren Meßwerten. Der PSC-Index als Maßzahl für die erfolgreiche Penetration der Spermien im Migrationstest, der aber auch als Parameter für die Qualitätskontrolle des als Standardmukus verwendeten Rindermukus eingesetzt wurde, streute bei Wiederholung der fotomikroskopischen Auswertung des gleichen Versuchs unter gleichen Kautelen um $+ / - 4,5\%$.

4. Ergebnisse

4.1 Nomographische Darstellungen innerhalb der Population

Die folgenden Nomogramme und graphischen Darstellungen funktioneller Zusammenhänge verdeutlichen die gemessenen Werte dieser Arbeit und zeigen die berechneten Korrelationen im Bild.

4.1.1 Spermiendichte

Abb. 7 veranschaulicht die Dichteverteilung der Ejakulate unter den Probanden. Demnach waren in der Untersuchung zwei Maxima, nämlich bei Konzentrationen um 30 Mill/ml sowie bei Konzentrationen zwischen 70 und 90 Mill/ml zu finden. Dichten unter 10 Mill/ml sowie über 200 Mill/ml ließen die große Varianz der Ejakulatdichten beim Menschen erkennen, waren aber absolut gesehen die Ausnahmen.

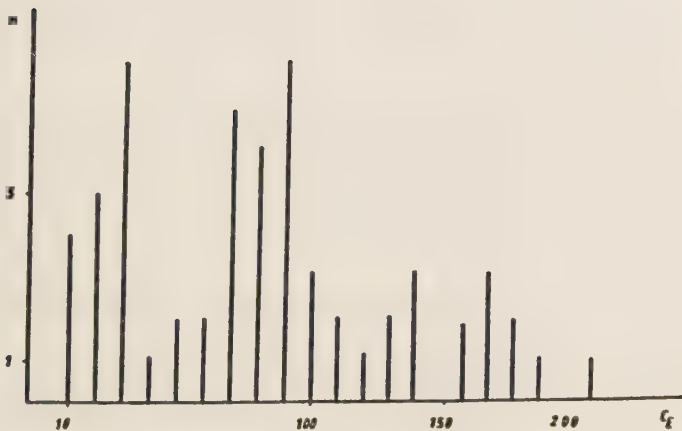


Abb. 7: Verteilung der Spermiendichten der Ausgangsejakulate: C_E (Mill/ml) unter den Probanden

4.1.2 Dichteverteilung unter den andrologischen Aspekten: Oligo-, Normo- und Polyzoospermie

Abb. 8 zeigt die Einordnung der Proben unter dem andrologischen Aspekt der Oligo-, Normo- und Polyzoospermie gemäß der WHO-Klassifikation (22).

Samenproben von 54 Probanden entsprachen im Hinblick auf die Zellkonzentration einer Normospermie.

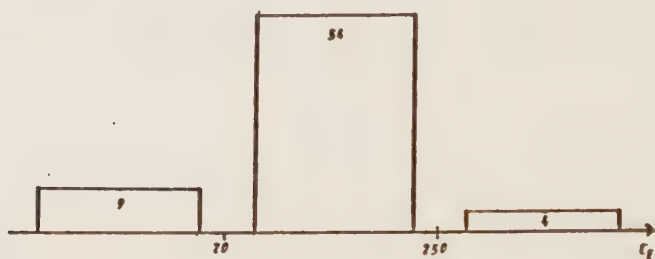


Abb. 8: Dichteverteilung der Ausgangsejakulate: (C_E (Mill/ml) in Bereiche der Oligo-, Poly- und Normozoospermie

4.2 Funktionelle Zusammenhänge und Korrelationen

4.2.1 Nativejakulatdichte (C_E) und Mittlere Geschwindigkeit ($\bar{v}_E$) der motilen Spermien im Ejakulat

Abb. 9 zeigt die Nativejakulatdichte (C_E) im funktionellen Vergleich mit der Mittleren Geschwindigkeit ($\bar{v}_E$) der motilen Spermien im Ausgangsejakulat.

Die graphischen Darstellungen zeigen die Mittelwerte in Einzelabschnitten.

Auffallend ist dabei, daß zunächst mit Zunahme der Spermienkonzentration im Ejakulat (C_E) auch eine Zunahme der Mittleren Geschwindigkeit der Spermien ($\bar{v}_E$) auftritt. Diese Tendenz ist im Bereich der Spermienkonzentrationen von etwa 20 Mill/ml bis 80 Mill/ml zu beobachten, wobei die Mittlere Geschwindigkeit von ca. 30 $\mu\text{m/s}$ auf Werte um 70 $\mu\text{m/s}$ ansteigt.

Bei zunehmender Konzentration der Spermien im Ausgangsejakulat allerdings steigt die Mittlere Geschwindigkeit nicht weiter an und pendelt sich auf einem Niveau zwischen 30 $\mu\text{m/s}$ und 60 $\mu\text{m/s}$ ein.

Ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen Spermienkonzentration (C_E) und der Mittleren Geschwindigkeit der motilen Spermien ($\bar{v}_E$) ist jedoch nicht zu erkennen.

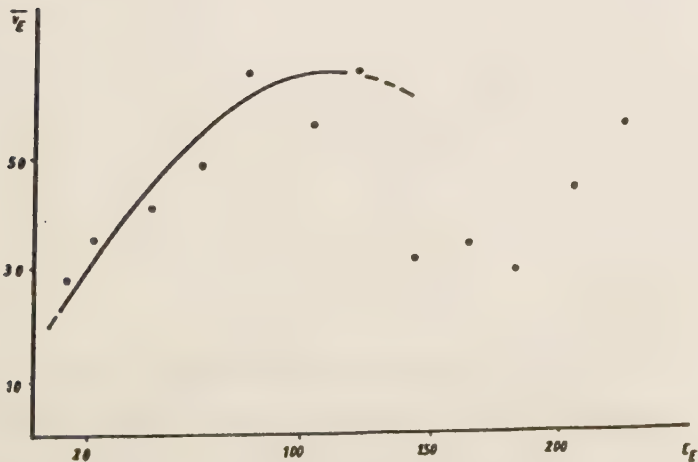


Abb. 9: Nativejakulatdichte: C_E (Mill/ml) im Vergleich zur Mittleren Geschwindigkeit der motilen Spermien im Ejakulat: $\bar{v}_E$ ($\mu\text{m/s}$)

4.2.2 Nativejakulatdichte (C_E) und prozentuale
motile Spermienfraktion ($\%Mot$)

Abb. 10 zeigt den Zusammenhang zwischen der Nativejakulatdichte (C_E) und dem prozentualen Anteil der motilen Spermien im Ejakulat ($\%Mot$).

Die graphische Darstellung läßt vermuten, daß der Anteil der motilen Spermien relativ unabhängig von der jeweiligen Spermiedichte im Ausgangsejakulat bei einem Wert um 50% liegt. Dies ist jedoch nur Ausdruck der Mittelwertbildung aller Prozentwerte und somit ohne eigentliche funktionelle Aussagekraft.

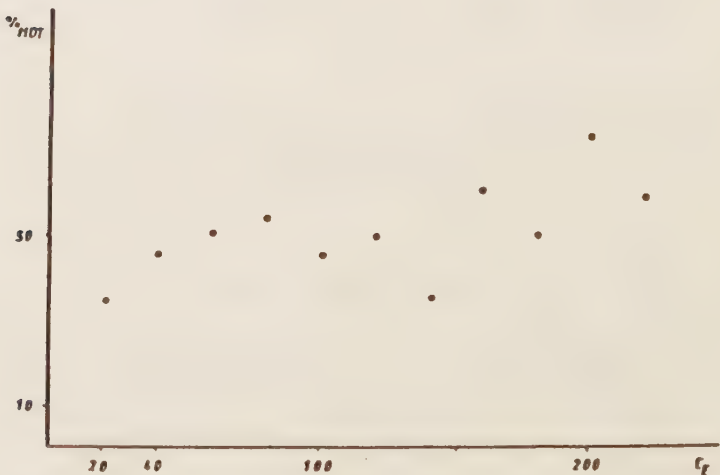


Abb. 10: Vergleich zwischen den Ausgangsejakulatdichten:
 C_E (Mill/ml) und dem jeweiligen prozentualen
Anteil motiler Spermien: $\%Mot$

4.2.3 Motile Spermienfraktion (%Mot) und ihre Mittlere Geschwindigkeit ($\bar{v}_E$)

Abb. 11 verdeutlicht, daß bei zunehmendem Anteil der motilen Spermien im Ausgangsejakulat bis zu einem prozentualen Anteil von etwa 70% auch die Mittlere Geschwindigkeit zunimmt. Der funktionelle Zusammenhang ist hochsignifikant über eine Leistungsregression beschrieben ($v = 0.8707 / p = 0.002$).

Bei höherem motilem Anteil verliert die funktionelle Zuordnung an Eindeutigkeit; Folge eines Beschwerungeffektes, der später noch diskutiert werden soll.

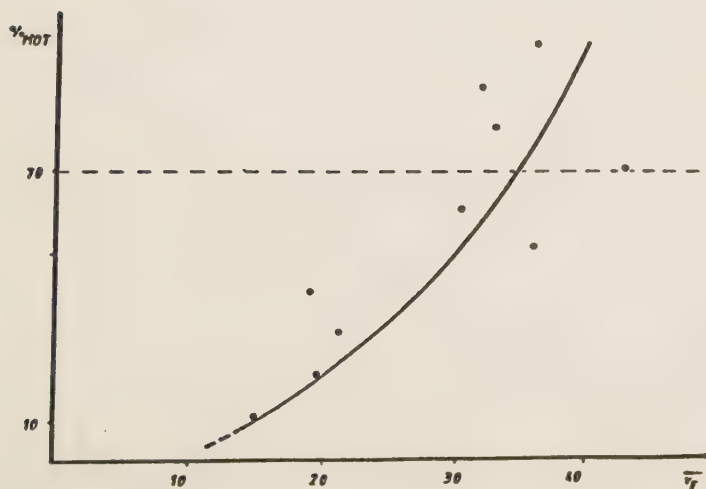


Abb. 11: Zusammenhang zwischen der Mittleren Geschwindigkeit: $\bar{v}_E$ ($\mu\text{m/s}$) und prozentual motilem Anteil der Spermien im Ausgangsejakulat.

4.2.4 Nativejakulatdichte (C_E) und Motiles Potential (MP)

Der Zusammenhang zwischen der prozentualen Zunahme des motilen Anteils der Spermien im Ausgangsejakulat und der jeweiligen Spermiedichte im Ejakulat wird durch die Einführung des motilen Potentials (MP) beschrieben (siehe 3.3), wobei das motile Potential nun als Ausdruck einer kinetischen Größe zunächst in direktem Vergleich zur Ejakulatdichte gesetzt werden soll (Abb. 12).

Es zeigt sich dabei, daß mit Zunahme der Spermiedichte im Ejakulat ein ansteigendes motiles Potential zu erwarten ist, ein Zusammenhang, der sich signifikant durch eine Leistungsregression darstellen läßt ($v = 0.926$, $p = 0.001$).

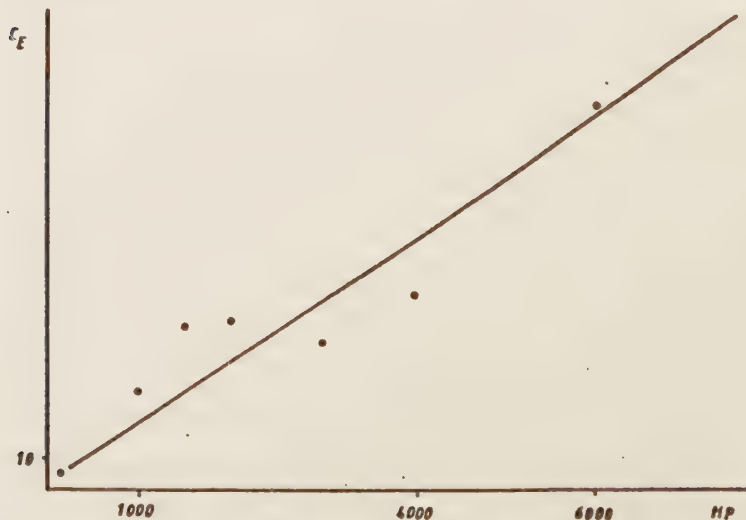


Abb. 12: Zusammenhang zwischen dem motilen Potential: MP (Mill $\mu\text{m/ml s}$) und den Spermiedichten der Ausgangsejakulate: C_E (Mill/ml)

4.2.5 Nativejakulatdichte (C_E) und
Migrationsdichte (C_M)

Zunächst soll anhand des Zusammenhangs zwischen der Spermien-
dichte der Ejakulate und der Dichte im Standardmukus
nach erfolgter Migration ein funktioneller Zusammenhang
zwischen Ausgangsejakulat und Migrationserfolg gesucht
werden.

Wie in Abb. 13 dargestellt, steigt zwar mit zunehmender
Spermiedichte der eingesetzten Ejakulate auch die Dichte
der Spermien im Mukus an, eine lineare Korrelation ist
daraus jedoch nicht abzuleiten.

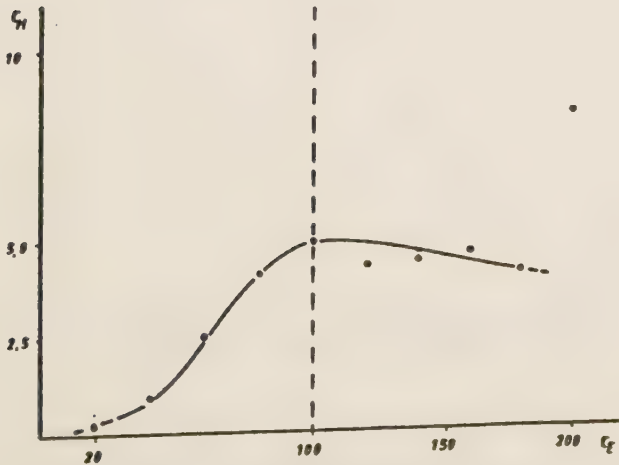


Abb. 13: Zusammenhang zwischen der Spermiedichte im
Ausgangsejakulat: C_E (Mill/ml) und der
Spermiedichte im Standardmukus: C_M (Mill/ml)

4.2.6 Motile Spermiendichte (C_E) und Migrationsdichte (C_M)

Bei alleiniger Berücksichtigung der Konzentration motiler Spermatozoen im Ausgangsejakulat (C_E) findet sich im Vergleich zur Spermienkonzentration im Standardmukus (C_M) ein funktioneller Zusammenhang (Abb. 14), beschrieben durch eine Leistungsregression mit signifikanter Korrelation ($r = 0.957$, $p = 0.044$).

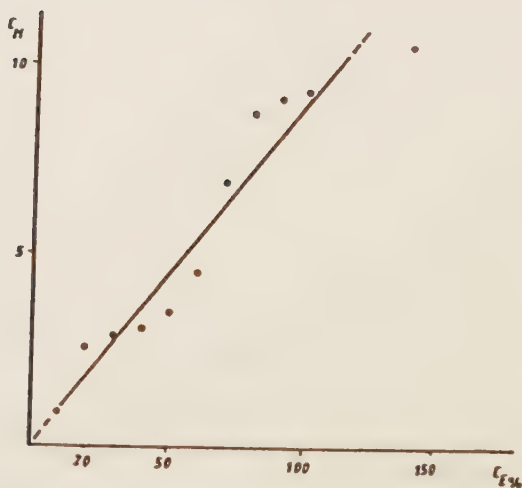


Abb. 14: Motile Spermiendichte: C_E (Mill/ml) der
Ausgangsejakulate im Vergleich zur jeweiligen
Spermiendichte im Standardmukus nach erfolg-
reicher Migration: C_M (Mill/ml)

4.2.7 Motiles Potential (MP) und Migrationsdichte (C_H)

Abb. 15 zeigt den Zusammenhang zwischen dem motilen Potential und der Spermienkonzentration im Standardmukus nach erfolgter Migration. In dem Bereich des motilen Potentials von 1000 bis etwa 6000 korrelieren die beiden Parameter hochsignifikant ($r = 0.96$, $p < 0.01$). Bei Werten des motilen Potentials über 6000 kann kein funktioneller Zusammenhang gefunden werden.

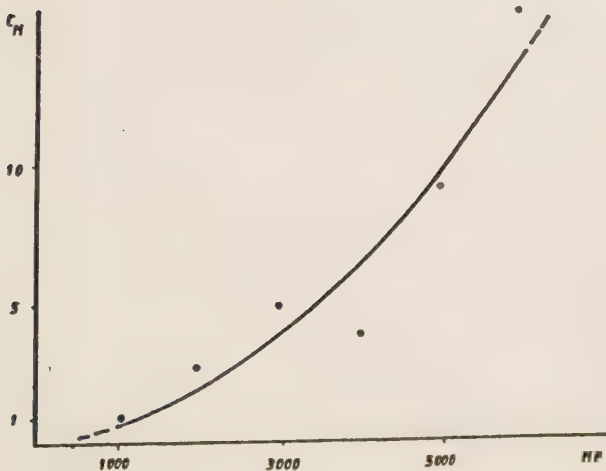


Abb. 15: Zusammenhang zwischen dem motilen Potential: MP und der Spermiedichte im Standardmukus nach erfolgreicher Migration: C_H (Mill/ml)

4.2.8 Mittlere Geschwindigkeit ($\bar{v}_E$) und
prozentualer Anteil der migrierten
Spermien ($C_M / C_E \cdot \%$)

Abb. 16 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen der Mitt-
leren Geschwindigkeit der motilen Spermien ($\bar{v}_E$) und dem
prozentualen Anteil der in den Standardmukus migrierten
Spermien bezogen auf das jeweilige Ausgangsejakulat $\frac{C_M}{C_E} \%$.
Die Parameter korrelieren hochsignifikant und lassen sich
funktionell über eine Leistungsregression darstellen ($r =$
0.9165, $p < 0.001$)

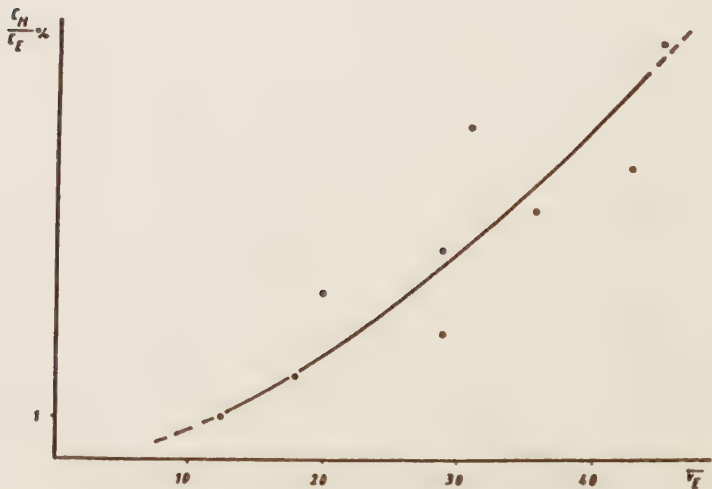


Abb. 16 Zusammenhang zwischen der mittleren Geschwin-
digkeit der motilen Spermien im Ausgangs-
ejakulat: $\bar{v}_E$ (μm/s) und dem prozentualen
Anteil erfolgreich migrierter Spermien: $\frac{C_M}{C_E} \%$

4.2.9 Motiles Potential (MP) und prozentualer Anteil der migrierten Spermien ($\frac{C_M}{C_E} \%$)

Oberhalb eines motilen Potentials von 3000 konnte, wie in 4.2.5 bis 4.2.7 bereits verdeutlicht, durch höhere Spermienkonzentration im Ausgangsejakulat zwar eine weitere Erhöhung der Spermiedichte im Mukus erreicht werden, dabei verringerte sich allerdings der prozentuale Anteil der eingewanderten Spermien bezogen auf die Ausgangskonzentration ($\frac{C_M}{C_E} \%$), in Abb. 17 dargestellt.

Während Abb. 15 den absoluten Zuwachs der Spermiedichte im Mukus bei zunehmendem Motilem Potential zeigt, relativiert die Darstellung in Abb. 17 die Menge der eingewanderten Spermatozoen zur Ausgangsejakulatdichte.

Bis zu einem Motilen Potential von 3000 kann der Zusammenhang zur prozentualen Einwanderung der Spermien der Ausgangsejakulate in den Standardmuskus signifikant korrelativ über eine lineare Regression beschrieben werden ($v = 0.995$, $p < 0.001$).

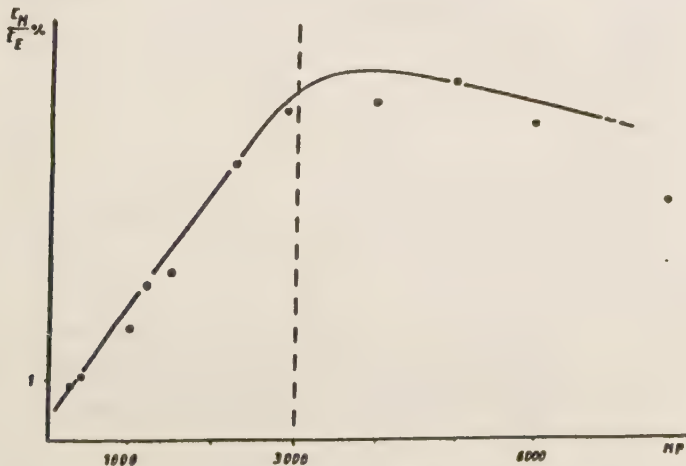


Abb. 17: Zusammenhang zwischen dem Motilen Potential: MP und dem Prozentualen Anteil erfolgreich in den Standardmukus migrierter Spermien: $\frac{C_M}{C_E} \%$.

4.2.10 Der PSC-Wert und seine Korrelationen

Abb. 18 zeigt den Zusammenhang des PSC-Wertes mit der jeweiligen Mittleren Geschwindigkeit der beweglichen Spermatozoen des Ausgangsejakulates ($\bar{v}_E$); dabei ist erkennbar, daß bei einer Geschwindigkeit über $20 \mu\text{m/s}$ der PSC-Wert relativ konstant bei etwa 20 liegt.

Somit wird deutlich, daß nach Überschreiten einer Mindestgeschwindigkeit der motilen Spermienfraktion von etwa $20 \mu\text{m/s}$ eine weitere Steigerung der erfolgreichen Penetration relativ unabhängig von der Mittleren Geschwindigkeit erfolgt.

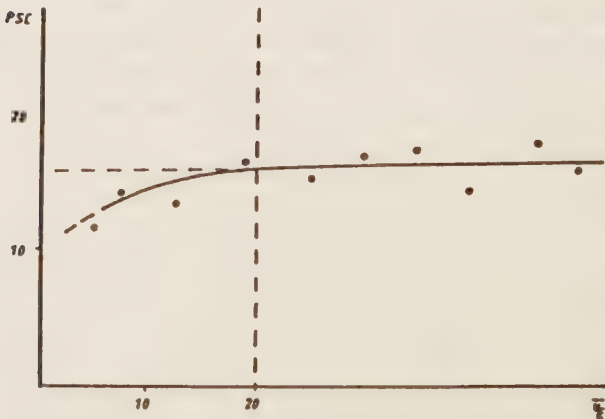


Abb. 18: Zusammenhang zwischen dem PSC-Wert und der Mittleren Geschwindigkeit der motilen Spermatozoen: $\bar{v}_E$ ($\mu\text{m/s}$) im Ausgangsejakulat

Abb. 19 zeigt den Zusammenhang zwischen der Konzentration der beweglichen Spermien ($C_E\%$) und dem PSC-Wert als Ausdruck einer erfolgreichen Migration.

Im Bereich der motilen Dichte zwischen 20 und 100 Mill/ml ist ein linearer Zusammenhang ($r = 0.77$, $p < 0.01$) gegeben; dabei steigt der PSC-Wert von 16 auf 23 an. Bei niedrigerem motilen Spermienanteil driftet der PSC-Wert zu hohen Werten ab, bei motilen Konzentrationen über 100 Mill/ml sinkt der PSC-Wert wieder rapide ab. In beiden Fällen kann keine funktionell-korrelative Beziehung zwischen motiler Dichte und dem PSC-Wert gefunden werden.

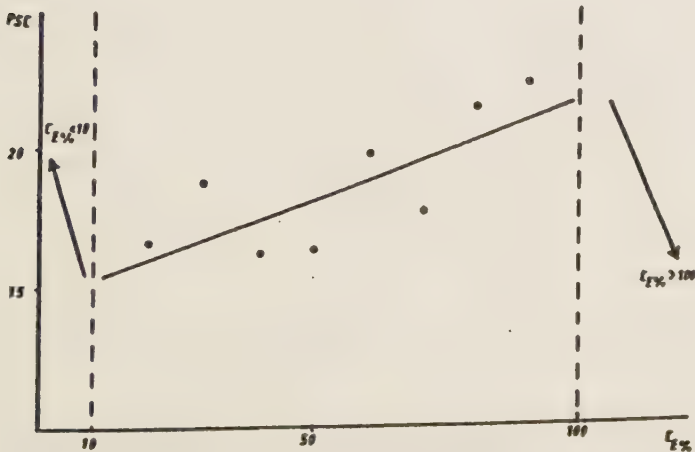


Abb. 19: Zusammenhang zwischen dem PSC-Wert und der motilen Spermiedichte: $C_E\%$ (Mill/ml) im Ausgangsejakulat.

Abb. 20 zeigt den PSC-Wert in funktionellem Zusammenhang mit dem prozentualen Anteil der in den Mukus migrierten Spermatozoen bezogen auf die Nativejakulatdichte (C_N / C_E %). Dabei zeigt sich in den Grenzen der Normozoospermie, nämlich zwischen 20 Mill/ml und 250 Mill/ml, ein signifikant korrelierender Zusammenhang ($r = 0.827$ / $p < 0.001$) der bei Berücksichtigung oligo- bzw. polyzoospermer Ausgangsejakulate nicht mehr gegeben ist.

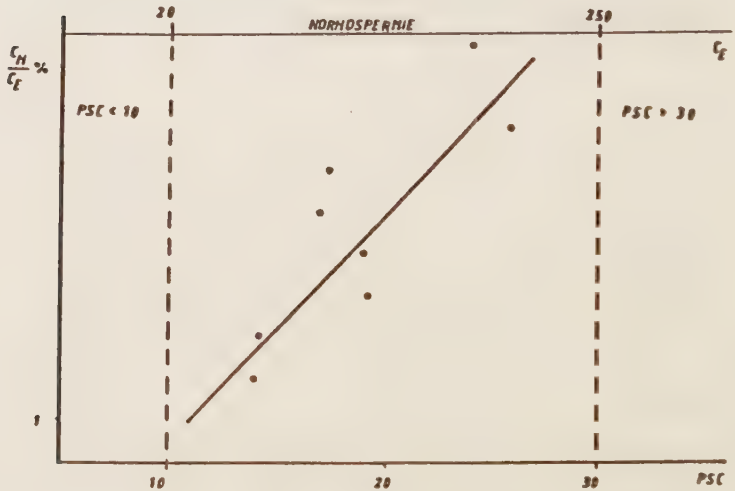


Abb. 20: Zusammenhang zwischen dem PSC-Wert und dem prozentualen Anteil erfolgreich in den Standardmukus eingewanderter Spermatozoen: C_N / C_E % im Rahmen der Normozoospermie.

4.2.11 Vergleich des Migrationstests mit anderen Spermienfunktionstesten

Die im Rahmen unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Spermienfunktionsteste (s. Abb. 2) sollen im folgenden auf korrelative Zusammenhänge hin untersucht werden.

A. Migrationstest und Spermienfusionskapazität an zona pellucida-freien Hamstereizellen

Untersuchungen an zona pellucida-freien Hamstereizellen, nach einem Modell von Yanagimachi (90) entwickelt, zeigten, daß zwar eine signifikante Korrelation ($p < 0.001$) zwischen der Spermienfusionskapazität und der Pathomorphologie der jeweiligen Ejakulate besteht, dagegen der Hamsteroovum-Penetrationstest nur eine schwache Korrelation zu den Migrationsparametern, speziell der Migrationsdichte mit $p < 0.05$, aufweist (93).

B. Migrationstest und Human-Zona-Pellucida- Bindungstest

In einem Spermienbindungstest an der zona pellucida menschlicher Eizellen, entwickelt nach Modellen von Schmeil und Gulyas (48), wurden im Rahmen von Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe deutliche Zusammenhänge ($p < 0.05$) zum entscheidenden Migrationsparameter $\frac{C}{C_M E}$ gefunden.

5. Diskussion

Die mikrophotographischen Untersuchungen der Ejakulate erlaubt es, qualitative und quantitative Parameter zu erfassen, zu dokumentieren und zu archivieren und somit auch jederzeit nachzuprüfen; dabei lag bei sorgfältiger Beachtung der Methode und Auswertung von 3 bis 5 Bildern pro Fragestellung und Proband die Schwankungsbreite der Ergebnisse zwischen 5% und 10%.

Der große Vorteil der mikrophotographischen Methode liegt vor allem im Erfassen dynamischer Phänomene der Ejakulate wie etwa der Motilität und Geschwindigkeit. Gerade auch zur Untersuchung und Beurteilung der Spermienbewegung nach typischem Muster (10, 15, 40, 58, 63) ist die Fotomethode in besonderer Weise geeignet. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde auf die Bewegungsscharakteristik der Spermien nicht näher eingegangen. Vergleiche der Grundparameter untereinander, nämlich der Ejakulatdichte, dem Anteil der beweglichen Spermien sowie der mittleren Geschwindigkeit der Spermien sollen zunächst diskutiert werden.

So findet sich zwischen der Zunahme der Spermienkonzentration im Ausgangsejakulat und der mittleren Spermien- geschwindigkeit kein eindeutiger Zusammenhang.

Während die Zunahme der Spermien- geschwindigkeit bei kleinen Dichten einer Zunahme des kinetischen Drucks entspricht, kann man die Abnahme der Geschwindigkeit bei höheren Dichten damit erklären, daß bei hoher Dichte physikalische Hemmnisse und eventuell biochemische Konditionen zu einer gegenseitigen Bewegungseinschränkung der Spermien führen. Die gemessenen Geschwindigkeiten lagen mit Werten zwischen 30 $\mu\text{m/s}$ und 70 $\mu\text{m/s}$ in Bereichen, wie sie auch von anderen Autoren beschrieben wurden (7, 15, 20, 40).

Ein weiterer Hinweis auf Bewegungshemmnisse der Spermien bei zunehmender Gesamtdichte des Ausgangsejakulates ist die Beobachtung, daß Ejakulate nach Verdünnen ihrer hohen Spermiendichte auf mittlere Dichte mittels Kulturmedium, höhere durchschnittliche Wanderungsgeschwindigkeiten ihrer beweglichen Spermatozoen aufwiesen, als vor ihrer Verdünnung, ein Effekt, der auch von anderen Autoren beschrieben wurde (42, 59, 78, 90).

Das Verhalten verschiedener Ejakulate unterschiedlicher Ausgangsdichten, die jeweils auf eine diskrete Konzentration verdünnt beziehungsweise konzentriert werden, könnte Gegenstand einer weiteren Untersuchung werden, sie hätte den Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

Schwerpunkt der Untersuchung war das Messen und Vergleichen von Spermienmigrationen im Standard-Zervixmukus, um somit zu einer objektivierbaren quantitativen Bewertung der Spermatozoenfunktion zu kommen.

Wie in Abb. 13 verdeutlicht, kann bei der Zunahme der Konzentration im Ausgangsejakulat eine höhere Migrationsrate in den Standardmukus angenommen werden. Eine mathematische Zuordnung wird erst beim Vergleich der Zunahme der motilen Dichte im Ausgangsejakulat mit der Migrationsdichte über eine Korrelation mit relativ hoher Signifikanz ($r = 0.957$, $p < 0.05$) ermöglicht (Abb. 14). Wird neben dem Motilitätszuwachs noch die Zunahme der mittleren Geschwindigkeit im Ausgangsejakulat einbezogen, nämlich in Form des Motilitätspotentials, so kann, beschrieben über eine Leistungsregression hoher Signifikanz ($r = 0.96$, $p < 0.01$) ein direkter Zusammenhang zur Migrationsdichte gefunden werden (Abb. 15).

Ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der möglichen Penetrationsfähigkeit der Spermien durch den weiblichen Genitaltrakt zeigt die hochsignifikante Korrelation zwischen der Durchschnittsgeschwindigkeit und dem relativen Anteil der in den Standardmukus eingewanderten Spermien (Abb. 16).

Wird die Migrationsdichte auf die jeweilige Spermatozoendichte im Ausgangsejakulat bezogen (C_M/C_E), so wird deutlich, daß bei einem Motilen Potential um den Wert 4000 und bei einem prozentualen Anteil migrierter Spermatozoen von 6% eine optimale Spermienmigration anzunehmen ist (Abb. 17).

Bis zu einem Wert von 6% wird die Penetration der Spermatozoen im wesentlichen durch die Motilität beeinflusst. Ab einem Wert C_M/C_E von ca. 6% wird die Spermien- dichte im Mukus hauptsächlich durch die Spermatozoen- konzentration im Ejakulat bestimmt. Dieser Vergleich entsprach den Untersuchungen anderer Autoren, die Korrelationen zwischen der Fertilität und der Motilität, Spermienedichte und Pathomorphologie in analoger Weise fanden (76). Besonders die Untersuchungen von Makler (57, 58, 59) zeigen, daß keine signifikante Verbesserung der Motilitätsparameter bei größerer Spermatozoenkonzentration als 80 Mill/ml zu erwarten ist.

Die Beobachtungen sprechen dafür, daß in einem Bereich C_M/C_E 2% neben den kinetischen auch membranorientierte Parameter für das Penetrationsverhalten der Spermatozoen in den Zervixmuskus mitverantwortlich sein könnten; eine Vermutung, die bei der gleichsinnigen Korrelation von C_M/C_E mit Ergebnissen des Zona- pellucida-Bindungstests und Hamstero-ovum-Penetrations- tests zusätzlich bestätigt werden konnte (48, 93).

Zusammenfassend läßt sich hier schon sagen, daß der relative Migrationserfolg (C/C_E) in einem in-vitro Migrationssystem einen Parameter widerspiegelt, der die inneren und äußeren Einflüsse auf die funktionelle Leistungsfähigkeit hinsichtlich der Migration und letztlich hinsichtlich der Fertilisation einer individuellen Spermienprobe widerspiegelt.

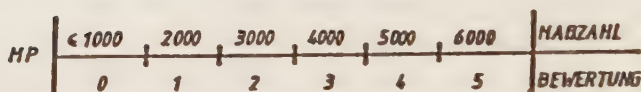
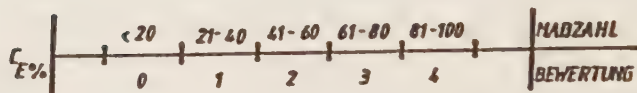
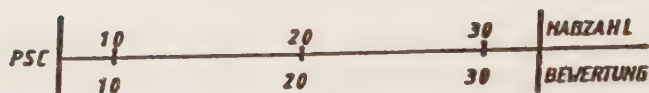
Der eindeutig funktionelle Zusammenhang des PSC-Wertes mit bestimmten Parametern der Studie erlaubt schließlich eine weitergehende qualifizierende und quantifizierende Beurteilung eines Ejakulates und ermöglicht dem Untersucher darüberhinaus, Aussagen über die Wahrscheinlichkeit einer späteren Fertilisation zu machen.

Zwei relativ lineare Zusammenhänge sind dabei von bemerkenswerter Eindeutigkeit: Einmal die Korrelation zwischen dem PSC-Wert und dem beweglichen Anteil des Ausgangsejakulates innerhalb der motilen Dichte von 10 bis 100 Mill/ml, wobei der PSC-Wert zwischen 16 und 23 liegt (Abb. 19), zum anderen die Korrelation zwischen dem PSC-Wert und dem prozentualen Anteil der eingewanderten Spermien, bezogen auf das Ausgangsejakulat innerhalb des Normospermiebereiches (Abb. 20).

Als Konsequenz der Erkenntnisse dieser Untersuchung soll modellhaft ein Diagnostikraster entwickelt werden, um ein Ejakulat auf seine Zervixmukus-Penetrationsfähigkeit, und somit auf die Voraussetzung einer späteren Fertilisation hin, beurteilen zu können und um damit eine eventuell notwendige Therapie gezielter einsetzen zu können.

In Abb. 21 werden die signifikant-funktionellen Zusammenhänge zwischen erfolgreicher Mukuspenetration und den Parametern C_E , MP und PSC-Wert in einem möglichen Diagnostic-Score (DS) praktisch verwertet.

DIAGNOSTIK SCORE (DS)



$$DS = PSC + C_{E\%} \cdot HP$$

NORMBEREICH: 10 < DS < 40

Abb. 21: Diagnostic Score als Screeningmethode zur Funktionsbeurteilung von Spermien im Migrationstest

Innerhalb des Normbereichs eines Ejakulates, dessen untere Grenze mit $DS_{\min} = 10$ und dessen obere Grenze mit $DS_{\max} = 40$ gewählt wurde, läßt sich mit zunehmender Größe des Kennwertes eine zunehmende Penetrationsfähigkeit der Spermien im Spermien-Mucus-System dokumentieren, was letztlich einer zunehmend wahrscheinlicheren Fertilisation entsprechen kann.

Mittels des Diagnostic-Scores (DS) ist es somit möglich, prospektive Aussagen über das Penetrationsverhalten der Spermien zu machen. Damit läßt sich die Ursache einer Sterilität in einer Partnerschaft differenzierter erfassen bzw. eine Verbesserung der Wahrscheinlichkeit einer Fertilität während einer Therapie abschätzen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der in-vitro-Fertilisationsteste kommen standardisierte Verfahren zur Anwendung, die reproduzierbar und objektivierbar kausale Zusammenhänge zwischen der Spermien Mukus-Eizellen Interaktion aufzeigen und Ansätze zur Diagnostik und Behandlung einschließlich der Verlaufskontrolle von Sterilitätspatienten liefern. Betrachtet man die korrelativen Zusammenhänge der einzelnen Parameter dieser Untersuchung unter dem Aspekt der gestellten Zielvorstellungen, so können die relevanten Korrelationen dazu dienen, vergleichende Beurteilungen von Spermaqualitäten sowie vom Migrationsverhalten im zervikalen Mukus zu machen. Darüberhinaus lassen sich prospektiv Chancen einer erfolgreichen Fertilisation abschätzen.

Der standardisierte Migrationstest könnte dabei als Basismethode der Sterilitätsdiagnostik Verwendung finden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aitken R.J., A. Templeton, R. Schats, F. Best, D. Richardson, O. Djahanbakheh and M. Lees (1983): Methods for assessing the functional capacity of human spermatozoa; their role in the selection of patients for in vitro fertilization. In: Beier, H.M., H.R. Lindner (eds.): Fertilization of the Human Egg in Vitro. Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio.
2. Alexander N.J: Evaluation of male infertility with an in vitro cervical mucus penetration test. Fertil Steril 36 : 201, 1981.
3. Amit A., A. Bergman, G. Yedwab, M.P. David, T.Z. Homanai, G. Paz, Human Sperm Penetration into Cervical Mucus in vitro: Correlation between its Quality, Penetration Capacity and Velocity, Gynecol. Obstet. Invest. 14, 283 (1982).
4. Amman R.P., S.S. Howard (1980): Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. J. Urol. 124, 211.
5. Barros C., J. Gonzales, E. Herrera, E. Bustos-Obregon (1979): Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability. Andrologia 11, 197.
6. Bedford J.M. 1978, Sperm-egg interaction: The specificity of human spermatozoa, Anat. Rec. 188, 477-488.

7. Belsey M.A., R. Eliasson, A.J. Gallegos, K.S. Moghiss, C.A. Paulsen, M.R.N. Prasad (1980): Laboratory manual for the examination of human semen and s n-cervical mucus interaction. Press Concern, Singapore.
8. Bergmann A, Amit A., M.P. David, Z.T. Homonnai, G.F. Paz: Penetration of human ejaculated spermatozoa into human and bovine cervical mucus. I. Correlation between penetration values. Fertil Steril 36:363, 1981.
9. Bergmann A., David M.P.: A method for improvement of sperm quality of an ejaculated human specimen using bovine cer-vical mucus as a biological filter. Journal of Andrology: 162, Vol 3, Nr. 3, 1982.
10. Bergmann P. 1955. Sperm migration and its relation to the morphology and motility of spermatozoa, Int. J. Fertil 1:45.
11. Biggers J.D., W.K. Whitten, D.G. Whittingham: The culture of mouse embryos in vitro. In Methods in Mammalian Embryology, ed. J.C. Daniel jr., W.H. Freeman and Company, San Francisco, chapter 6, 1971.
12. Blasco L: Clinical approach to the evaluation of sperm-cervical mucus interactions. Fertil Steril 28:1133, 1977.
13. Botella-Llusia, J. 1956. Measurement of linear progression of human spermatozoa as index of male fertility, Int. J. Fertil. 1:113.

14. Burger M.M., Burkart W., Weinbaum G., Jumblatt J.:
Cell-Cell Recognition: Molecular aspects.
Recognition and its relation to morphogenetic
processes in general, in Cell-Cell Recognition,
ed. ASG Curtis, Cambridge University Press, 1,
1978.
15. Castenholz A.: Photokymographische Registriermethode
zur Darstellung und Analyse der Spermatozoenbe-
wegungen. *Andrologia* 6:155, 1974.
16. Carlborg L.: 1969. Determination of sperm migration
in small samples of cervical mucus, *Acta Endo-
crinol.* 62:732.
17. Danezis J., S. Sujan, A. Sobrero: Evaluation of the
postcoital test. *Fertil. Steril.* 13 (1962) 559.
18. Davidson H. A. 1968. The postcoital test, *Practitioner*
201:467.
19. Davajan V., Nakamura R.M., Khurma K.: Spermatozoan
transport in cervical mucus. *Obstet Gynecol Surv*
25:1, 1970.
20. Dott H.M. (1979): Spermatozoan motility. *Bibliogra-
phy of Reprod.* 32, 1 and 81.
21. Dresdner R.D., Katz D.F.: Relationships of mammalian
sperm motility and morphology to hydrodynamic
aspects of cell function. *Biol. of Repr.* 25,
920-930, 1981
22. Eliasson R.: Semen analysis and laboratory work-up.
In *Male Infertility*, Edited by ATK Cockett, RL
Urry. New York, Grune and Stratton, 1977, p 169.

23. Freund M., Peterson R.N.: Semen evaluation and infertility. In Human Semen and Fertility. Regulation in Men, Edited by ESE Hafez. St. Louis, C.V. Mosby Co, 1976 p 344.
24. Friberg J.: A simple and sensitive micromethod for demonstration of sperm agglutinating activity serum from infertile men and woman. Acta Obstet. Gynecol. Scand. (Supp.) 36 (1974), 21.
25. Gaddum-Rosse P., Blandau R.J., W.I. Lee: Sperm penetration into cervical mucus in vitro. I. Comparative studies. Fertil Steril 33 : 636, 1980.
26. Gaddum-Rosse P., Blandau R.J., W.I. Lee: Sperm penetration into cervical mucus in vitro. II. Human spermatozoa in bovine mucus. Fertil Steril. 33 : 644, 1980.
27. Gibor Y., Garcia C.J. Cohen M.R., Scommegna A.: The cyclical changes in the physical properties of the cervical mucous and the results of the postcoital tests. Fertil Steril 21:20, 1970.
28. Giner J., G. Merino, J. Luna, R. Aznar: Evaluation of the Sims-Huhner postcoital test in fertile couples. Fertil. Steril. 25 (1974) 145.
29. Glass R.H. and Mroueh A. 1967. The postcoital test and semen analysis, Fertil. Steril. 18:314
30. Insler V., Melmed H., Eichenbrenner I., Serr D.M., Lunenfeld B: The cervical score. Int. J. Obstet Gynecol 10:223, 1972.

31. Insler V., Bernstein D., Glezerman M.: Diagnosis and classification of the cervical factor of infertility. In *The Uterine Cervix in Reproduction*, Edited by V. Insler, G. Bettendorf. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1977, p 253.
32. Jaszczyk S., and Hafez E.S.E. 1975. Physiopathology of sperm transport in the human female. In Hafez, E.S.E. and Thibault C., editors: *The biology of spermatozoa*, Basel, S. Karger AG.
33. Jaszczyk S., and Hafez E.S.E. 1973. Sperm migration through the uterine cervix during the menstrual cycle in macaques, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 115:1070.
34. Jaszczyk S., Hafez E.S.E.: Postcoital test. Human semen and fertility regulation in men; C.V. Mosby Company, St. Louis 1976, 375:381.
35. Jette N.T., Glass R.H.: Prognostic value of the postcoital test. *Fertil Steril* 23:29, 1972.
36. Jones W.R: Immunological Aspects of Infertility, in *Immunology of Human reproduction*, eds. J.S. Scott and W.R. Jones, Academic Press, Grune & Stratton, chapter 13, 375, 1976.
37. Jones H.W., A.A. Acosta, M.C. Andrews, J.E. Garcia, G.S. Jones, R. Mantzavinos, J. McDowell, B.A. Sandow, L. Vecck, T.W. Whiblex, C.A. Wilkes, G.L. Wright (1983): What ist a pregnancy? A question for programs of in vitro fertilization *Fertil. Steril.* 40, 728.

38. Kaden R., R. Bauer: Die sterile Ehe aus andrologischer Sicht. In: R. Kaden (Hrsg.): Allgemeine Pathologie der Sexualfunktion. Deutscher Ärzteverlag, 1980, Band 32.
39. Katz D.F., Overstreet J.W., Hanson F.W.: A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus. Fertil Steril 33: 179, 1980.
40. Katz D.F., Diel L., Overstreet J.W., Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. Biology of Repr. 26, S. 566-570, 1982.
41. Katz D.F., Overstreet J.W., Hanson F.W., Variations within and amongst normalmen of movement characteristics of seminal spermatozoa. 1981. J. Reprod. Fert. 62, S. 221-228.
42. Katz D.F., Mills R.N., Pritchett T.R.: The movement of human spermatozoa in cervical mucus. J. Reprod Fertil 53:259, 1978.
43. Kesserü E.: In vivo sperm penetration and in vitro sperm migration tests. Fertil Steril 24:584, 1973.
44. Kerin J.F., Matthews C.D., Svigos J.M., Makin A.E., Symons R.G., Smeaton T.C.: Linear and quantitative migration of stored sperm through cervical mucus during the periovulatory period. Fertil Steril 27:1054, 1976.
45. Kovacs G.T., Newman G.B., Henson G.L.: The postcoital test: What is normal? BrMedJ 1:818, 1978.
r J.: A simple sperm penetration test.

46. Kremer J.: A simple sperm penetration test. Int J Fertil 10:209, 1965. r J., Sperm penetration in
47. Kremer J., Sperm penetration in cervical mucus: In Fertility Investigation Thesis, 24. N.V. Groningen, Holland, Dinkkerij Van Denderen (1968).
48. Kurz H., Vergleichende Untersuchungen zu initialen Fertilisationsmechanismen im Human-Zona Pellucida-Bindungstest, Dissertation, Universität München, 1984.
49. Lee W.I., P. Gaddum-Rosse, R.J. Blandau: Sperm penetration into cervical mucus in vitro. III. Effect of freezing on estrous bovine cervical mucus. Fertil Steril 36:209, 1981.
50. Lee W.I.: Dynamic laser scattering study of sperm migration through cervical mucus. In Scattering Techniques Applied to Supramolecular and Nonequilibrium Systems, Edited by S.H. Chen, B. Chu, R. Nossal, Wellesley Mass, NATO Advanced Study Institute, 1981. In press.
51. Leidenberger B.: Sterilität der Frau. Deutsches Ärzteblatt 73, 2635 (1976).
52. Lopata, A., J.B. Brown, J.F. Leeton, J. Talbot, C. Wood (1978): In vitro fertilization of preovulatory oocytes and embryo transfer in infertile patients treated with clomiphene and chorionic gonadotropin. Fertil. Steril. 30, 27.

53. Lopata A. (1980): Success and failures in human in vitro fertilization. *Nature* 288, 642.
54. Lübke F., M. Strauber: Die sterile Ehe aus gynäkologischer Sicht. In: R. Kaden (Hrsg.): *Allgemeine Pathologie der Sexualfunktionen*. Deutscher Ärzte-Verlag, 1980, Band 32.
55. Lunenfeld V., V. Insler: *Diagnosis and treatment of functional infertility*. Grosse-Verlag, Berlin, 1978.
56. MacDonald R.R., and Lumley, I.B. 1970 b. Sperm penetration of cervical mucus, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 107:846.
57. Makler A.: A new chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril* 30:313, 1978.
58. Makler A.: A new multiple exposure photography method for sperm motility determination. *Fertil Steril* 30:192, 1978.
59. Makler A., Y. Urbach, E. Lefler, D. Merzbach (1981): factors affecting sperm motility. *Fertil. Steril.* 35, 666-670.
60. Makler A., J. Itskovitze, J.M. Brandes, E. Paldi: Sperm velocity and percentage of motility in 100 normospermic specimens analyzed by the multiple exposure photography (MEP) method. *Fertil Steril* 31:155, 1979.

61. Makler A.: I. Zaidise, E. Paldi, J.M. Brandes:
Factors affecting sperm motility. I. In vitro
change in motility with time after ejaculation.
Fertility und Sterility Vol.31, Nr. 2 (1979).
62. Makler A.: The improved ten-micrometer chamber for
rapid sperm count and motility evaluation.
Fertility and Sterility Vol.3, Nr.3, 337-338,
1980.
63. Makler A.: Use of the elaborated multiple exposure
photography (MEP) method in routine sperm moti-
lity analysis and for research purposes. Ferti-
lity and Sterility, 1960, 1980.
64. MacLeod J., Gold R.Z., The male factor in fertility
and infertility. II. Spermatozoon counts in
1000 men of known fertility and in 1000 cases
of infertile marriages. J. Uol 66: 436, 1951.
65. Miller E., Kurzrok, R. 1932. Biochemical studies of
human semen. III. Factors affecting migration
of sperm through the cervix. Am. J. Obstet.
Gynecol. 24:19.
66. Moghissi K.S., T.N. Evans: Infertility. In: Obstre-
trics and Gynecology. Ed.; D.N. Danforth.
Harper and Row, Hagerstown, Maryland 1977,
p. 812.
67. Moghissi K.S., 1972. The function of the cervix in
infertility. Fertil. Steril. 23:295.
68. Moghissi K.S., Postcoital test: physiologic basis,
technique and interpretation. Fertil. Steril.
27 (1976) 117.

69. Moghissi K.S., Dahich D., Levine J., Neuhaus O.W.:
Mechanism of sperm migration. Fertil. Steril.
15:15, 1964.
70. Nancy J.A., Evaluation of male infertility with an
in vitro cervical mucus penetration test.
Fertility and Sterility Vol. 36, Nr. 2, 201,
1981.
71. Overstreet J.W., Katz D.F., Hanson F.W., Fonseca
J.R.: A simple inexpensive method for objective
assessment of human sperm movement character-
istics. Fertil Steril 31:162-172, 1979.
72. Overstreet J.W., C. Coats D.F. Katz, F.W. Hanson:
The importance of seminal plasma for sperm
penetration of human cervical mucus. Fertil
Steril 34:569, 1980.
73. Overstreet J.W., Henbree W.C.: Penetration of the
zona pellucida of non-living human oocytes by
human spermatozoa in vitro. Fertil Steril
27:815, 1976.
74. Overstreet J.W., R. Yanagimachi, D.F. Katz,
K. Hayashi, F.W. Hanson (1980): Penetration of
human spermatozoa into the human zona pellucida
and the zona-free hamster egg: A study of fer-
tile donors and infertile patients. Fertil.
Steril. 33, 534.

75. Palm S., W.B. Schill, O. Wallner, R. Prinzen, H. Fritz: Occurrence of components of the Kallikrein-Kinin system in human genital tract secretions and their possible funktion in stimulation of sperm motility and migration. In: Kinis Pharmacodynamics and Biological Roles. Eds.: F. Sicuteri, N. Back, G.L. Haberland. Plenum Publishing, New York, 1976.
76. Palm V.S., R. Meiers, S., Langgartner, H. Kurz und W.B. Schill: Selektive andrologische Funktionsdiagnostik durch Spermatozoenmigrations- und "Fertilisations"-Tests. Aus: Spermakonservierung, Insemination, In-Vitro-Fertilisation. Hrsg.: W.B. Schill und W. Bollmann, Urban u. Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore 1986, 196:202.
77. Runnenbaum B., T. Rabe: Hormonale Ursachen der weiblichen Sterilität. Monatskurse f.d. ärztl.Fortbildung 30, 488 u. 524 (1980).
78. Rogers B., van Campen H., Ueno M., Lambert H., Bronson R., Male R.: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. Fertility and Sterility 664: 670, Vol. 32, Nr. 6 (1979).
79. Schwartz D., A. Laplanche, P. Jouannet, G. David (1979): Withinsubject variability of human semen in regard to sperm count, volume, total number of spermatozoa and length of abstinence. J. Reprod. Fertil. 57, 391.

80. Schwartz D., M.J. Mayaux, A. Spira, M.L. Moscato, P. Jouannet, F. Czyglik, G. David (1983): Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men. *Fertil Steril* 39, 530. J.M., 1869. On the microscope as an aid in the
81. Sims J.M. 1869. On the microscope as an aid in the diagnosis and treatment of sterility. *N. Y. Med. J.* 8:393.
82. Sobrero A.J., J. MacLeod: The immediate postcoital test. *Fertil.Steril.* 13 (1962) 184.
83. Tampion D., R.A. Gibbons: Swimming rate of bull spermatozoa in various media and the effect of dilution. *J. Reprod. Fertil.* 5 (1963 b) 259.
84. Tredway D.R., Settlege D.S., Nakamura R.M., Motoshima M., Umezaki C.U., Mishell D.R. Jr: Significance of timing for the postcoital evaluation of cervical mucus. *Am. J. Obstet Gynecol* 121:387, 1975.
85. Ulstein M. 1972b: Sperm penetration of cervical mucus as a criterion of male fertility, *Acta Obstet. Gynecol. Scand* 51:335.
86. Ulstein M., and Fjällbrant B. 1973. Interrelation of different parameters at cervical mucus penetration of spermatozoa, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 52:295.
87. Van Bruggen E.F.J., J. Kremer: Electron microscopy of bovine and human cervical mucus. *Int. J. Fertil.* 15 (1970) 50.

88. Wood C., G. Baker, A. Trounson (1984): Current status and future prospects. In: Wood, C., A. Trounson: Clinical in vitro Fertilization, S. 17. Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio.
89. Wood C., I. Johnston (1984): Selection of patients. In: Wood C., A. Trounson: Clinical in vitro Fertilization. S. 30. Springer, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio.
90. Yanagimachi R., H. Yanagimachi, B.J. Rogers (1976): The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 15, 471.
91. Zaneveld L.J.D., Polakovsky K.L.: Collection and physical examination of the ejaculate. In Techniques of Human Andrology, Edited by ESE Hafez. Amsterdam, North Holland Publishing Co. 1977, p. 147.
92. Human in vitro-fertilisation and embryo transfer. Recommen Dations to european medical research councils. Lancet II., 1187 (1983).
93. Langartner S., Vergleichende methodische Untersuchungen zur Wertigkeit von Spermiennmigration und Hamsteroovum-Penetrationstest; Dissertation, Universität München 1986.

LEBENS LAUF

Name: Richard Meiers
geb.: 17.06.1949 in Ens Dorf/Saarland
Vater: Ernst Meiers, Realschuloberlehrer
Mutter: Regina Meiers geb. Luxenburger

Ausbildung:

1956 - 1960	Katholische Volksschule, Ens Dorf
1960 - 1970	Staatl. Realgymnasium, Völklingen
1970 - 1975	Biologie/Chemie-Studium an der Universität des Saarlandes Staatsexamensabschluß
1975 - 1979	Medizinstudium an der RWTH-Aachen
1979 - 1982	Weiterführung des Medizinstudiums an der LMU-München
25.06.1982	Approbation als Arzt
01.05.1983 -	Facharztausbildung in der Chirurgie als
15.07.1984	Assistenzarzt der Diakonissenanstalt München
seit 15.07.1984	Weiterführung der Facharztausbildung in der Chirurgie als Assistenzarzt am Krankenhaus Landsberg a. Lech

Druck:
UNIKOPIE
Adalbertstr. 18
8000 München 40
Tel.: 33 33 63

